

10

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-126294

(43)Date of publication of application : 16.05.1995

(51)Int.Cl.

C07K 14/47  
C12N 9/99  
// A23L 1/30  
A61K 38/55

(21)Application number : 06-047711

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 22.02.1994

(72)Inventor : SERIZAWA ATSUSHI  
ISHIKAWA HIDETOSHI  
TAKAYAMA TOMOSHIGE

(30)Priority

Priority number : 05125164 Priority date : 28.04.1993 Priority country : JP

## (54) NEW CYSTEINE PROTEASE INHIBITOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the inhibitor having a high cysteine protease inhibitory effect, capable of inhibiting absorption of bone by osteoclast and useful as a raw material for medicines and foods.

CONSTITUTION: A cysteine protease inhibitor has following properties: (1) an affinity to an immobilized carboxymethylated papain. (2) an inhibitory effect on papain. (3) the molecular weight of  $16 \pm 2$ KDa (by SDS-PAGE) or  $13 \pm 2$ KDa. and (4) the N-terminal amino acid sequence of the sequence no. 1 or 2 in the sequence table.

Asp Thr Gly Asp Ala Lys Val Gly Glu Leu Glu Glu Ser Pro Asa  
1 5 10 15  
Asp Thr Glu Val Glu Lys  
4

Gly Asp Ala Lys Val Gly Thr Leu Glu Glu Leu Ser Pro Asa Asp Pro  
1 5 10 15  
Glu Thr Glu Lys  
20

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3460851

[Date of registration] 15.08.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-126294

(43)公開日 平成7年(1995)5月16日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C07K 14/47

8318-4H

C12N 9/99

ZNA

9152-4B

// A23L 1/30

A

A61K 38/55

ABJ

A61K 37/64

ABJ

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全13頁)

(21)出願番号 特願平6-47711

(22)出願日 平成6年(1994)2月22日

(31)優先権主張番号 特願平5-125164

(32)優先日 平5(1993)4月28日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72)発明者 芹澤 篤

北海道札幌市東区本町一条4丁目3-15-203

(72)発明者 石川 秀敏

北海道札幌市西区八軒一条東2丁目2-33-606

(72)発明者 高山 朋栄

北海道恵庭市有明町785

(74)代理人 弁理士 藤野 清也

(54)【発明の名称】新規システインプロテアーゼインヒビター

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 次の特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) 分子量 $16 \pm 2$  KDa (SDS-PAGEによる) または $13 \pm 2$  KDa。

(4) 配列表配列番号1又は2のN末端アミノ酸配列を有する。

【効果】 高いシステインプロテアーゼ阻害活性を示し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。医薬、食品の原料として有用である。

配列

Arg Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn

1 5 10 15 (1)

Asp Pro Gln Val Glu Lys

20

配列

Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn Asp Pro

1 5 10 15 (2)

Gln Val Glu Lys

20

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGE による分子量測定で  $16 \pm 2$  KDa または  $13 \pm 2$  KDa を示す。

(4) 配列表配列番号 1 で表される N 末端アミノ酸配列を有する。

【請求項 2】 下記特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGE による分子量測定で  $16 \pm 2$  KDa または  $13 \pm 2$  KDa を示す。

(4) 配列表配列番号 2 で表される N 末端アミノ酸配列を有する。

【請求項 3】 下記特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGE による分子量測定で  $16 \pm 2$  KDa または  $13 \pm 2$  KDa を示す。

(4) 配列表配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。

【請求項 4】 下記特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

(1) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

(2) ババインに対する阻害活性を有する。

(3) SDS-PAGE による分子量測定で  $16 \pm 2$  KDa または  $13 \pm 2$  KDa を示す。

(4) 配列表配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規なシステインプロテアーゼインヒビターに関する。本発明により提供される新規なシステインプロテアーゼインヒビターは破骨細胞の骨吸収作用に対する阻害効果を有し、骨の老化抑制を目的とした食品原料や医薬品原料として有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 システインプロテアーゼインヒビターは、活性中心に SH 基を持ったシステインプロテアーゼのタンパク質分解活性を阻害する物質であり、動物組織、細胞、血液中や尿中に見出されている。このようなシステインプロテアーゼインヒビターであって蛋白性の物質はシスタチンと総称されている。これまでに見出されたシステインプロテアーゼインヒビターであるシス

チンは、その分子構造から 3 つのファミリーに分類されている (Biochem. J., 236, 312 (1986))。この文献によれば、ファミリー 1 (ステフィンファミリー) にはラット肝臓由来のシスタチン  $\beta$  (Biochem. Biophys. Res. Commun., 115, 902 (1983))、ラット表皮由来のシスタチン  $\alpha$  (Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 149 (1984)) やヒトの白血球に見出されたステフィン A (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1487 (1983)) が含まれている。これらのシスタチンはいずれも分子量約 12 KDa を示し、糖を持たない。

【0003】 また、ファミリー 2 には、ヒト尿由来のシスタチン C (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3024 (1982))、卵白シスタチン (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1487 (1983)) がこのファミリーに分類され、ウシ初乳由来のシスタチン (FEBS Lett., 186, 41 (1985)) もこのファミリーに属する。このファミリーに属するものは分子量約 13 ~ 15 KDa を示し、ファミリー 1 と同様に糖を有していない。

【0004】 さらに、血漿タンパク質であるヒトキニノーゲン (Biochemistry, 23, 5691 (1984))、ラットの T キニノーゲン (Biochem. Biophys. Res. Commun., 129, 280 (1985)) など、キニノーゲン類がファミリー 3 を構成している。キニノーゲン類は分子量 78 KDa の高分子キニノーゲンと分子量 45 KDa の低分子キニノーゲンが存在することが知られている。本発明者らは、牛初乳より、糖鎖を有する、分子量約 57 KDa の新規なシステインプロテアーゼインヒビターを単離しこれの特願平 5 - 84191 として特許出願を行っている。

【0005】 システインプロテアーゼインヒビターの有用な作用の 1 つとして、ウィルスの増殖阻害作用が確認されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 1072 (1985))。また、骨疾患モデルの動物の骨より、カルシウムの遊離を抑制する作用を示すことから、特開平 2 - 223529 号公報には抗アレルギー剤や骨疾患治療剤としての用途が開示されている。また特開昭 61 - 225130 号公報には卵白由来のシスタチンを精製し、これを抗ウイルス剤として使用する技術が開示されている。

【0006】 また特開昭 64 - 2582 号公報にはシスタチン  $\alpha$  の合成遺伝子、特開平 1 - 71492 号公報にはシスタチン B の合成遺伝子、特開平 1 - 157390 号公報にはシスタチン A の合成遺伝子がそれぞれ開示されており、遺伝子操作によりシスタチンを生産することも可能となってきた。

【0007】 近年、高齢化の進展にともない、破骨細胞の骨吸収に起因する骨粗鬆症が急増している。現在、破骨細胞の吸収活性を抑える医薬として、カルシトニン製剤がある。しかしこの製剤は、医薬品として、サケやウナギ由来のホルモンを利用したホルモン製剤であり、食品素材から得られ、食品素材として使えるような安全な

物質についてはあまり検討されていないのが現状である。

#### 【 0 0 0 8 】

【解決しようとする課題】本発明者らは、食品素材から得られる安全でしかも食品素材として使えるよう、乳中に存在することが知られているシステインプロテアーゼインヒビターについて検討をすすめたところ、従来の乳由来のシスタチンとして知られているものと明らかに異なる、新規なシスタチン様の物質を見出した。この物質はシスタチンファミリー 2 に属するシスタチン C と比較してやや大きな分子量を有しており、またこれまで知られているシスタチン類にない新規な N 末端アミノ酸配列を有している。従って本発明は、乳由来の新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターを提供することを課題とする。

#### 【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】本発明により提供される乳由来の新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターは下記の特性により特定される。

( 1 ) 固定化したカルボキシメチル化ババインに結合性を有する。

( 2 ) ババインに対する阻害活性を有する。

( 3 ) SDS-PAGE による分子量測定で  $16 \pm 2$  KDa または  $13 \pm 2$  KDa を示す。

( 4 ) N 末端アミノ酸配列は、配列表配列番号 1 あるいは配列番号 2 のアミノ酸配列のいずれかを示す( 配列表配列番号 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸残基のうち、N 末端側 2 残基に相当する Arg-Pro 残基が削除され、3 番目の Gly から始まったものである ) 。

【 0 0 1 0 】本発明の物質は、乳由来のシスタチン C として知られている物質やその他のシスタチンファミリーの物質と比較して、その N 末端アミノ酸配列が明らかに異なっており、またホモロジー検索を行ってもこのような N 末端アミノ酸配列を報告した文献はない。本発明の物質は新規な蛋白質である。本発明の物質の分子量は、上記したように SDS-PAGE、還元、非還元のいずれの条件においても、 $16 \pm 2$  KDa、または  $13 \pm 2$  KDa のいずれかである。この内  $16$  KDa を示す物質はバス染色陽性であることから糖鎖の存在が推定され、また一方  $13$  KDa を示す物質はバス染色陰性であることから、糖鎖を有しない。この  $16$  KDa を示す物質は、以下に示す分析から  $13$  KDa の物質に糖鎖が付加したものと考えられる。

【 0 0 1 1 】本発明の物質は、固定化したカルボキシメチル化ババインによるアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により分子量の異なる 2 つの画分として分離される。この分離した画分を逆相クロマトグラフィーに付すことにより、それぞれ単一のピークとして回収することができる。この逆相クロマトグラフィー単一ピークを SDS-PAGE に付してもやはり単一のバンド

として検出される。このバンドの分子量は上記に示す値である。この逆相クロマトグラフィーの単一ピークを分離し、気相法によるアミノ酸シーケンサー (ABI 社製

120A 型アナライザー) により N 末端アミノ酸配列を分析したところ、1 ピークから 2 つのアミノ酸配列が検出された。この N 末端アミノ酸配列は、配列表配列番号 1 と配列番号 2 に記載したものである。このような配列が共存していることは、分泌の過程における蛋白質のプロセッシングに由来すると考えられ、Arg 末端と Gly 末端の 2 種類が共存していることが確認された。このアミノ酸配列は  $16$  KDa の物質、 $13$  KDa の物質とも共通であり、 $13$  KDa の物質は、バス染色陰性で糖鎖が結合していないためにこのような分子量を示すものと考えられる。

【 0 0 1 2 】またシスタチンファミリーのうち、糖鎖を有する物質として知られているキニノーゲンと比較した場合、本発明の物質の糖鎖を有する物質の分子量は  $16 \pm 2$  KDa である。これに対してキニノーゲンには分子量が  $78$  KDa の高分子キニノーゲンと分子量が  $45$  KDa の低分子キニノーゲンが知られているが、本発明の糖鎖を有する物質は分子量が  $16 \pm 2$  KDa であり、分子量測定により明確にキニノーゲンとは区別できる。このように、本発明により提供される物質は新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターといえることができる。さらに後述するように本発明物質は乳中から分離されるシスタチンファミリー 2 の物質と比較して、システインプロテアーゼの阻害活性は同程度の値を示す。

【 0 0 1 3 】本発明の物質はヒト、ウシなど哺乳動物の乳から回収することができるが、特にウシ乳中から容易に回収することができる。本発明の物質は泌乳期間のうち特に初乳中に大量に含有されるが、通常の乳中にも含有される。これらの乳を原料として、上述の文献に記載されているように、代表的なシステインプロテアーゼであるババインなどの親和性によるアフィニティークロマトグラフィー等の操作により分離することができる。

【 0 0 1 4 】すなわち、ウシ脱脂初乳に、終濃度  $0.5$  M となるように NaCl を添加し、これをカルボキシメチル化ババイン固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、ウシ初乳シスタチン類の濃縮画分を調製する。この画分には既知のシスタチンと本発明物質を含有している。特に、NaCl の添加により非特異的吸着を抑制し、比活性の高い濃縮画分を調製できる。あるいは、酸によるホエー画分を調製し、この酸性ホエー画分を硫酸沈殿により塩析する画分を集め、さらに膜処理により脱塩したものを出発材料として、カルボキシメチル化ババイン固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、ウシ初乳シスタチン類の濃縮画分を調製する。さらに、この画分をゲル濾過クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって、本発明物質であるシ

スタチン様システインプロテアーゼインヒビターと既知のシスタチンとを分離することができる。精製にあたっては、この他に蛋白質の精製方法として知られている逆相クロマトグラフィーやHPLCなどの方法を組み合わせても良い。

【0015】本発明物質のパバインに対する阻害活性は Barrettらの方法 ("Methods in enzymology" Vol.80 1981, pp771) に準じて測定することができる。即ち 0.1 M ベンゾイル-D, L-アルギニン-4-ニトロアニリド (Benzoil-D,L-arginine-4-nitroanilide) のジメチルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩衝液として、2 mM の EDTA を含む、20 mM リン酸緩衝液に使用直前にシステインを終濃度 8 mM となるように添加した溶液を用いて、比色法により酵素の活性を測定することにより、酵素の阻害率を求める方法である。本発明の新規システインプロテアーゼインヒビターは、乳中のシスタチンを対照として阻害活性を測定した場合、蛋白質あたりの阻害活性はほぼ同程度の阻害率を示す。

【0016】本発明物質をゲル等電点電気泳動法 (Fast system Pharmacia社製) により等電点を測定したところ、pI が、16 KDa の物質は 4.3-5.2 を示し、13 KDa の物質は pI 5.2-5.8 を示している。

【0017】本発明物質のうち、13 KDa を示す物質と 16 KDa を示す物質をそれぞれ、還元ピリジルエチル化し、アクロモバクター・リティカスのプロテアーゼあるいは、臭化シアンを用いて常法によって加水分解を行い、ペプチドマッピングを行ったところ、糖鎖の結合していると推定されるペプチド以外は、まったく一致した。このことから本発明のシステインプロテアーゼインヒビターは、同一のアミノ酸配列を有しており、N末端が異なった物質および、糖鎖の結合したものと結合していないものが、存在していることが推定された。アミノ酸配列の推定一次構造を図5に、また 13 KDa で N末端がデリーションされていないもののアミノ酸配列の分析結果を配列表配列番号5に示した。なお、Xaa はアミノ酸名が確定していない。この配列を公知のシスタチンファミリーのアミノ酸配列とホモロジーを比較した結果を図6に示した。この結果から、本発明の新規システインプロテアーゼインヒビターは、シスタチンファミリー

$$\text{比活性}[\text{unit/mg}] = \{ (A_0 - A_1) \times 1.43 \} / \{ 8.8 \times 30 \times W_1 \} \quad (I)$$

A<sub>0</sub> : インヒビターフリーの吸光度

A<sub>1</sub> : サンプルの吸光度

W<sub>1</sub> : サンプル溶液中のタンパク質量[mg]

#### 【0021】(2) 硫安分画

分娩後1日以内に搾乳したウシ初乳9 l から遠心分離により脱脂乳を調製し、常法に従い酸ホエーを調製した。ホエーに飽和度 35 % になるように硫安を添加し生じた沈殿を遠心分離により除去した。さらに飽和度 55 % となるように硫安を添加し、生じた沈殿を遠心分離により

2 のコンセンサス領域とは高い相同性を示すが、それ以外の部位のアミノ酸配列は異なっており、シスタチンファミリーに属する新規なシステインプロテアーゼインヒビターであると言える。

【0018】本発明の物質は乳中に常在する蛋白質であり、その安全性は高いものと考えられる。従って、既知のシスタチンに見出される、抗ウイルス剤、抗アレルギー剤、骨疾患治療剤として用いることが可能であり、必要に応じて製剤化するか、あるいは単独で用いることが可能である。また食品や飲料中に混入させて用いることもできる。医薬品として用いる場合には注射剤、経口剤、座剤などが例示できる。また蛋白質製剤は通常注射剤として用いられることが多く、薬学的に有効な量の本発明物質を含有させ、製薬学的に許容しうる安定剤や賦形剤、等張化剤、無痛化剤、防腐剤、緩衝剤などを含有させて製剤とすることができる。

【0019】以下に実施例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【実施例1】

#### 20 新規システインプロテアーゼインヒビターの精製

##### (1) インヒビター活性測定

システインプロテアーゼに対するインヒビター活性は、パバインに対する阻害活性を Barrett らの方法 ("Methods in enzymology" Vol.80 1981, pp771) に準じて測定した。0.1 M ベンゾイル-D, L-アルギニン-4-ニトロアニリド (Benzoil-D,L-arginine-4-nitroanilide) ジメチルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩衝液として、2 mM の EDTA を含む、20 mM リン酸緩衝液に使用直前にシステインを終濃度 8 mM となるように添加した。パバインを 0.5 mg/ml の濃度で、システインを含まない測定用緩衝液に溶解した。また、反応停止用溶液として 30 % 酢酸溶液を使用した。測定は、以下の手順で行った。測定用チューブに 1 ml システインを含むリン酸緩衝液と 0.1 ml のパバイン溶液を入れ、37℃で5分間インキュベートした。次いで、試料溶液 0.1 ml 基質溶液 30 μl を加え攪拌した。37℃で30分間反応後、0.2 ml の反応停止液を加え、410 nm の吸光度を測定した。インヒビター活性は次式 (I) より求めた。

##### 40 【0020】

回収した。回収した沈殿に含まれる硫安を除去するため、分画分子量 6 KDa のフォローファイバー型 UF 膜 (旭化成製) により DF 処理した。すなわち、沈殿を 50 mM リン酸-0.5 M NaCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同じ緩衝液に対し DF 処理した。

##### 【0022】(3) カルボキシメチル化パバインアフィニティークロマトグラフィー

カルボキシメチル化パバインをトレシルトヨパール (Tresyl-Toyopearl, 東ソー製) に結合させた担体を 50 φ

×150mmのカラムへ充填後、50mMリン酸-0.5M NaCl緩衝液(pH7.0)で平衡化した。このカラムへ、先の硫酸飽和度35-55%沈殿画分を通液し、システインプロテアーゼインヒビターを吸着させた。通液後、平衡化に使用した緩衝液に0.1% Tween-20を添加した溶液でカラムを洗浄した。次いで、20mM酢酸-0.5M NaCl溶液でシステインプロテアーゼインヒビターを溶出させ、溶出画分を直ちに1M NaOH溶液で中和した。

$$\text{活性}[\%] = \{ (A_0 - A_1) / A_0 \} \times 100 \quad (\text{II})$$

【0025】結果を図1に示す。アフィニティークロマトグラフィーで調製した画分を分子量6KDaのフクロファイバー型UF膜(旭化成製)により濃縮した。0.1M 炭酸水素アンモニウム緩衝液で平衡化したカラム(50φ×750mm)に通液した。溶出液を分取し、インヒビター活性を示す画分のうち、既知のシスタチンと明らかに異なる二つのピークで、図1に矢印で示した画分(CPI<sub>11</sub>, CPI<sub>12</sub>)を回収し、それぞれ、逆相クロマトグラフィーに供した。

【0026】(5) 逆相クロマトグラフィー  
VYDAC 214TP54 (Vydac社製) カラム(4.6mm×250mm)を用いた、逆相クロマトグラフィーを実施した。カラムの平衡化には、0.08% TFA(トリフロロ酢酸)を添加した5%CH<sub>3</sub>CN-95%H<sub>2</sub>Oを、溶離液として、0.06% TFA添加した80% CH<sub>3</sub>CN-20% H<sub>2</sub>Oを使用し、1%/分の直線グラジエントで溶出した。各ピークを分取し、インヒビター活性を測定した結果(図2)、図中にP<sub>11</sub>およびP<sub>12</sub>と示したピークに活性が認められた。活性画分の一部を同一条件で逆相クロマトグラフィーに供した結果、それぞれ単一のピークを示した。2つの活性画分を凍結乾燥

#### 【0023】(4) ゲルフィルトレーション

アフィニティークロマトグラフィーで調製した画分に対し、Sephacryl S-200HR(Pharmacia製)を用いたゲルフィルトレーションを実施した。各画分の活性は実施例1(1)に示したようにしてA<sub>0</sub>:インヒビターフリーの吸光度、A<sub>1</sub>:サンプルの吸光度を求め、次式(II)によって相対活性値を求めた。

【0024】

し、P<sub>11</sub>およびP<sub>12</sub>からそれぞれ、0.47mg、0.68mgの凍結乾燥標品が得られた。

【0027】

【実施例2】本実施例においては、実施例1で得たP<sub>11</sub>およびP<sub>12</sub>の二つのシステインプロテアーゼインヒビターの特性値を測定した例を示す。

#### (1) SDS-PAGE

図3に逆相クロマトグラフィーで精製した2種のインヒビターのSDS-PAGEの結果を示した。P<sub>11</sub>およびP<sub>12</sub>共に単一バンドを示し、不純物は認められなかった。また、還元、非還元条件下でも変化が無いことから、両者共に単一のポリペプチドから成ることが示された。また、P<sub>11</sub>およびP<sub>12</sub>の分子量は、それぞれ約16KDa、約13KDaであることが確認された。

#### 【0028】(2) インヒビター活性

精製した16KDa、13KDaおよび既知の初乳シスタチンのババインに対する阻害活性を実施例1に記載した方法に従って比較した。比較測定の結果を表1に示した。

【0029】

【表1】

初乳システインプロテアーゼインヒビターの活性

比活性	CPI <sub>11</sub> <sup>1)</sup>	CPI <sub>12</sub> <sup>1)</sup>	coCys <sup>1)</sup>
[unit/mg]	0.310	0.284	0.270

- 1) 16kDa システインプロテアーゼインヒビター
- 2) 13kDa システインプロテアーゼインヒビター
- 3) 初乳シスタチン

【0030】表1から、新たに得られた2種のインヒビターは、既知の初乳シスタチンと同程度の比活性を示した。

#### 【0031】(3) N末端アミノ酸配列

精製した16KDa、13KDaの分子量を有するシステインプロテアーゼインヒビターのN末端アミノ酸配列分析を気相法によるアミノ酸シーケンサーを用いて実施した。両者ともほとんどのサイクルで2つのシグナルを示し、かつ両者のシグナルは完全に一致していたことから、両画分とも同一の2成分のペプチド鎖を含んでいる

ことが確認された。また、2成分の内、一方のペプチド鎖のN末端が2残基欠如していると仮定した場合、18残基が一致する2種の配列が得られた。このことから、分析に供した2つの画分中には、それぞれ2種のインヒビターが含まれ、2種のうち、一方のインヒビターは、N末端の2残基を欠如したフォームであると判断できた。この配列を配列表配列番号1、配列番号2に示した。また比較のために既知の初乳シスタチンのN末端アミノ酸配列を配列表配列番号3に、ヒトシスタチンCの配列を配列表配列番号4に示した。これらの既知のシスタチンと本発明の新規システインプロテアーゼ阻害物質は全く異なる配列であった。これらの4物質の比較した配列を図4に示した。本法で精製したシステインプロテアーゼ

インヒビターのN末端アミノ酸配列は、既知の初乳シスタチンやその他の既知のシスタチン類とも全く相同性を示していなかった。

【0032】(4) 精製13KDaのアミノ酸配列分析と一次構造解析

精製した13KDaのシステインプロテアーゼインヒビターの全アミノ酸配列の分析を行った。精製システインプロテアーゼインヒビターを還元ビリジルエチル化し、アクロモバクター・リティカス (*Achromobacter lyticus*) プロテアーゼ (API) あるいは臭化シアン (CNBr) で加水分解し、ついで逆相クロマトグラフィーによりペプチドを分離し、アミノ酸配列の分析を行った。アミノ酸配列の分析は上記(3)と同様に行い、全121アミノ酸配列を確認した。N末端アミノ酸に相当する部分は、(3)で述べたように2つのピークが観察され、一方はグリシンからはじまっており、一方は、N末端アミノ酸を決定することができなかった。121アミノ

酸の配列を図5および配列表配列番号5に示した。

【0033】この配列を公知のシスタチンファミリーに属するシステインプロテアーゼインヒビターと比較を行った。それぞれのアミノ酸配列を図6に示した。配列中には、カゼインキナーゼ (casein kinase II) によるリン酸化サイト(#14 Ser, #35Ser)が2箇所存在し、リン酸化蛋白質であることが推定された。またシスタチンファミリーのコンセンサス配列が含まれていた。13KDaのシステインプロテアーゼとシスタチンファミリー2のホモロジーをSWISS-PORT (R24.0 December 1992) を用いて解析を行い、下記表2の結果を得た。公知のシスタチンファミリーとは異なった蛋白質であることが確認できた。

【0034】

【表2】本発明システインプロテアーゼインヒビターに対する公知ファミリー2シスタチンのホモロジー

システインプロテアーゼインヒビター	%
卵白シスタチン	36.5
初乳シスタチン	34.5
ヒトシスタチンC	33.9
ラットシスタチンC	42.4
ヒトシスタチンS	33.0
ヒトシスタチンSN	38.0
ヒトシスタチンSA	31.2
ラットシスタチンS	32.8
ヒトシスタチンD	31.0

【0035】(4) その他の特性

精製した16KDa、13KDaのシステインプロテアーゼインヒビターの糖鎖の有無をPAS染色で確認した。その結果、16KDaのインヒビターのみが陽性を示し、糖鎖を含有していることを確認できた。

【0036】また、両画をゲル等電電気泳動法 (Fast system Pharmacia 社製) に供し、pI値を求めた。その結果、16KDaのインヒビターのpI値は4.3-5.2を示し、13KDaのインヒビターのpI値は、5.2-5.8を示した。以上の結果から、本発明物質は、糖鎖を含有する分子量16KDaと糖鎖を有しない13KDaの2つの分子量を持つ物質であって、N末端アミノ酸配列が2種類あることが判明した。

【0037】

配列

Arg Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn

1

5

10

15

Asp Pro Gln Val Gln Lys

20

【0039】配列番号：2

【発明の効果】本発明により新規システインプロテアーゼインヒビターが提供される。本発明により提供される物質は既知のシスタチンと比較してN末端アミノ酸配列、および全アミノ酸配列の異なる新規物質であり、破骨細胞の骨吸収作用に対する阻害効果を有し、骨の老化抑制を目的とした食品原料や医薬品原料として有用である。

【0038】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

50 配列の長さ20

11

12

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

トポロジー：直鎖状

配列

Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn Asp Pro

1

5

10

15

Gln Val Gln Lys

20

【 0 0 4 0 】 配列番号： 3

トポロジー：直鎖状

配列の長さ 2 2

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

10

配列

Arg Leu Leu Gly Gly Leu Met Glu Ala Asp Val Asp Glu Glu Gly Val

1

5

10

15

Gln Glu Ala Leu Ser Phe

20

【 0 0 4 1 】 配列番号： 4

トポロジー：直鎖状

配列の長さ 2 2

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly Val

1

5

10

15

Arg Arg Ala Leu Asp Phe

20

【 0 0 4 2 】 配列番号： 5

トポロジー：直鎖状

配列の長さ 1 2 1

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Xaa Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn

5

10

15

Asp Pro Gln Val Gln Lys Ala Ala Gln Val Ala Val Ala Asn Tyr Asn

20

25

30

Met Gly Ser Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Arg Asp Ile Thr Ile Leu Arg

35

40

45

Ala His Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr Tyr Leu Thr Val Asp

50

55

60

Met Glu Ser Thr Ala Cys Arg Lys Ser Ala Val Ala Gly Asp His Val

65

70

75

80

Asp Leu Thr Thr Cys Pro Leu Ala Ala Glu Ala Gln Gln Glu Lys Leu

85

90

95

Arg Cys Asp Phe Glu Ile Leu Val Val Pro Trp Lys Asn Ser Ser Gln

100

105

110

Leu Leu Lys Trp Asp Cys Val Ser Leu

115

120

【 0 0 4 3 】 配列番号： 6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ 1 1 9

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn Asp Pro

5

10

15

Gln Val Gln Lys Ala Ala Gln Val Ala Val Ala Asn Tyr Asn Met Gly



13  
20 25 30  
Ser Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Arg Asp Ile Thr Ile Leu Arg Ala His  
35 40 45  
Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr Tyr Leu Thr Val Asp Met Glu  
50 55 60  
Ser Thr Ala Cys Arg Lys Ser Ala Val Ala Gly Asp His Val Asp Leu  
65 70 75 80  
Thr Thr Cys Pro Leu Ala Ala Glu Ala Gln Gln Glu Lys Leu Arg Cys  
85 90 95  
Asp Phe Glu Ile Leu Val Val Pro Trp Lys Asn Ser Ser Gln Leu Leu  
100 105 110  
Lys Trp Asp Cys Val Ser Leu  
115

【図面の簡単な説明】

【図 1】システインプロテアーゼインヒビターのゲル濾過による分画パターンを示す。

【符号の説明】

—●— 活性を示す。

—— OD 280 nmの吸光度を示す。

【図 2】ゲル濾過によって得られた画分の逆相 HPLC パターンを示す。これは、図 1 に示した画分をそれぞれ逆相 HPLC に付して得られたパターンを同時に記載したものである。

【図 3】HPLC により分画した本発明システインプロテアーゼインヒビターの SDS-PAGE のパターンを示す。

【符号の説明】

1 分子量 16 KDa システインプロテアーゼインヒビターの還元状態のパターン

2 分子量 13 KDa システインプロテアーゼインヒビターの還元状態のパターン

3 分子量 16 KDa システインプロテアーゼインヒビターの非還元状態のパターン

4 は、分子量 13 KDa システインプロテアーゼインヒビターの非還元状態のパターン

【図 4】本発明のシステインプロテアーゼインヒビター

の N 末端アミノ酸配列、既知物質である初乳シスタチン、ヒトシスタチン C の N 末端アミノ酸配列の比較を示す。

【符号の説明】

a: 本発明のシステインプロテアーゼインヒビターの N 末端アミノ酸配列

b: 本発明のシステインプロテアーゼインヒビターの N 末端アミノ酸配列

c: 初乳シスタチン N 末端アミノ酸配列

d: ヒトシスタチン C

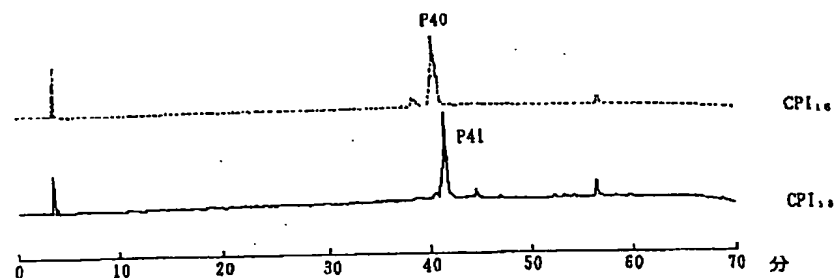
【図 5】本発明による、13 KDa のシステインプロテアーゼインヒビターのアミノ酸配列の一次構造を示す。

【図 6】本発明による、13 KDa のシステインプロテアーゼインヒビターと公知のシスタチンファミリーの第 40 番目までのアミノ酸配列の相同図を示す。

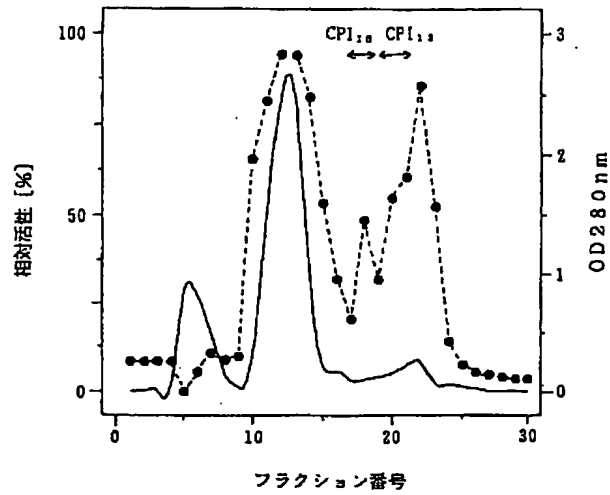
【図 7】本発明による、13 KDa のシステインプロテアーゼインヒビターと公知のシスタチンファミリーの第 41 番目から 85 番目までのアミノ酸配列の相同図を示す。

【図 8】本発明による、13 KDa のシステインプロテアーゼインヒビターと公知のシスタチンファミリーの第 86 番目から 121 番目までのアミノ酸配列の相同図を示す。

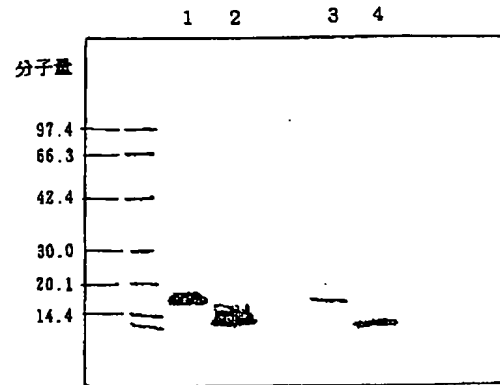
【図 2】



【図 1】



【図 3】



【図 4】

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
- a: ArgProGlyAspArgLysValGlyGluLeuGlnGluLeuSerProAsnAspProGlnValGlnLys
- b: — GlyAspArgLysValGlyGluLeuGlnGluLeuSerProAsnAspProGlnValGlnLys
- c: ArgLeuLeuGlyGlyLeuMetGluAlaAspValAspGluGluGlyValGlnGluAlaLeuSerPhe
- d: ArgLeuVALGlyGlyProMetAspAlaSerValGluGluGluGlyValArgArgAlaLeuAspPhe

【図 5】

5                      10                      \* 15                      20                      25  
 XaaProGlyAspArgLysValGlyGluLeuGlnGluLeuSerProAsnAspProGlnValGlnLysAlaAlaGln  
 30                      \*35                      40                      45                      50  
 ValAlaValAlaAsnTyrAsnMetGlySerAsnSerAspTyrTyrTyrArgAspIleThrIleLeuArgAlaHis  
 55                      60                      65                      70                      75  
 SerGlnLeuValAlaGlyIleLysTyrTyrLeuThrValAspMetGluSerThrAlaCysArgLysSerAlaVal  
 80                      85                      90                      95                      100  
 AlaGlyAspHisValAspLeuThrThrCysProLeuAlaAlaGluAlaGlnGlnGluLysLeuArgCysAspPhe  
 105                      \* 110                      115                      120  
 GluIleLeuValValProTrpLysAsnSerSerGluLeuLeuLysTrpAspCysValSerLeu

\*Ser<sub>14</sub>, Ser<sub>35</sub>, リン酸化部位  
 \*Asn<sub>109</sub>, グリコシル化部位

【図 6】

CP1 KaaProGlyAspArgLysValHisTyrIleuGluGlnGluLeuGluProAsnAspProGlnValGlnLysAlaGlnValAlaValAlaAsnTyrAsnMetGlySerAsn — SerAspTyrTyr 5 10 15 20 25 30 35 40

cc ValLeuGlySerGluAspArgSerArgLeuLeuGlyValIleProValProValAspGluAsnAspGluGlyLeuGlnArgAlaLeuGlnPheAlaMetAlaGluTyrAsnArgAlaSerAsn — AspLysTyrSer 10 15 20 25 30 35 40

bc ArgLeuLeuGlyGlyLeuMetGluAlaAspValAsnGluGluGlyValGlnGluAlaLeuSerPheAlaValSerGluPheAsnLysArgSerAsn — AspAlaTyrGln 10 15 20 25 30 35 40

hc GlySerSerProGlyLysProIleProArgLeuValGlyGlyProMetAspAlaSerValGlnGluGluGlyValArgArgAlaLeuAspPheAlaValGlyGluTyrAsnLysAlaSerAsn — AspMetTyrHis 20 25 30 35 40 45 50

rc AlaGlyThrSerArgProProArgLeuLeuGlyValIleProGlnGlnAlaAspAlaSerGluGluGlyValGlnArgAlaLeuAspPheAlaValSerGluTyrAsnLysGlySerAsn — AspAlaTyrHis 10 20 30 40 50

hs SerSerSerIleGlnGlnAsnArgIleIleProGlyGlyIleTyrAspAlaAspLeuAsnAspGluTrpValGlnArgAlaLeuIlePheAlaIleSerGluTyrAsnLysAlaThrGlu — AsnGluTyrTyr 10 20 30 40 50

hsn TrpSerProLysGlnGluAspArgIleIleProGlyGlyIleTyrAsnAlaAspLeuAsnAspGluTrpValGlnArgAlaLeuIlePheAlaIleSerGluTyrAsnLysAlaThrLys — AspAspTyrTyr 30 40 50 60

hsa TrpSerProLysGlnGluAspArgIleIleGluGlyGlyIleTyrAspAlaAspLeuAsnAspGluArgValGlnArgAlaLeuIlePheValIleSerGluTyrAsnLysAlaThrGlu — AspGluTyrTyr 30 40 50 60

rs HisGluThrLeuSerCysLeuGlyIlePheLeuGlyGlyIleGluLysSerSerMetGluGluGlyAlaSerGluAlaLeuAsnTyrAlaValaAsnGluTyrAsnGluLysAsnSer — AspLeuTyrLeu 10 20 30 40 50

hd GlySerAlaSerAlaGlnScrArgThrLeuAlaGlyGlyIleIleIleAlaThrAsnLeuAsnAspLysSerValGlnArgAlaLeuAspPheAlaIleSerGluTyrAsnLysValaIleAsnLysAsnGluTyrTyr 10 20 30 40 50 60

魚, ファミリー2シスタチンのコンセンサス配列

グリコシル化部位

リン酸化部位

CPI, 牛乳山米新規シェア70.7-ゼンゼン- cc, 卵白シスタチン bc, 初乳シスタチン hc, ヒトシスタチンC

rc. 101シスタチンC hls, エシスタチンS hsn, エシスタチンSN hd, エシスタチンD

	50	60	70	80
CPI	TyrArgAspIleThrIleLeuArgAlaIleSerIleLeuValAlaIleValIleLysTyrTyrLeuThrValAspMetGluSerThrAlaCysArgLysSerAlaValAlaGlyAspIleValAspLeuThrThrCys			
cc	SerArgValValArgValIleSerAlaLysArgGluIleLeuValSerIleValIleLysTyrIleLeuGlnValGluIleGlyArgThrThrLysProLysSerSerGlyAspLeuGln	10	20	100
bc	SerArgValValArgValValArgAlaArgLysIleValValSerIleValAsnTyrPheLeuAspValGluLeuGlyArgThrCysThrLysSerGlnAlaAsnLeuAsp	40	50	10
lc	SerArgAlaLeuGlnValValArgAlaArgLysIleValValAlaIleValValAsnTyrPheLeuAspValGluLeuGlyArgThrCysThrLysThrGlnProAsnLeuAsp	20	60	
rc	SerArgAlaIleGlnValValArgAlaArgLysIleLeuValAlaIleValIleAsnTyrTyrLeuAspValGluMetGlyArgThrThrLysThrLysSerGlnThrAsnLeuThr	30	70	
lis	ArgArgProLeuGlnValLeuArgAlaArgGluIleThrValGlyGlyValAsnTyrPheIleAspValGluValGlyArgThrIleCysThrLysSerGlnProAsnLeuAsp	50	80	ThrCys
hsn	ArgArgProLeuArgValLeuArgAlaArgGlnIleThrValGlyGlyValAsnTyrPheIleAspValGluValGlyArgThrIleCysThrLysSerGlnProAsnLeuAsp	70	90	ThrCys
hsa	ArgArgLeuLeuArgValLeuArgAlaArgGlnIleThrValGlyGlyValAsnTyrPheIleAspValGluValGlyArgThrIleCysThrLysSerGlnProAsnLeuAsp	70	100	ThrCys
rs	SerArgValValGluValLysAspValGlnLysGlnValValAlaIleThrLysPhePheAspValIleLeuGlyLysThrIleCysLeuLysThrGlnGlyAspLeuThr	50	60	AsnCys
hd	SerArgProLeuGlnValMetAlaAlaTyrGlnGluIleValGlyGlyValAsnTyrTyrPheAsnValLysPheGlyArgThrThrCysThrLysSerGlnProAsnLeuAsp	20	80	AsnCys

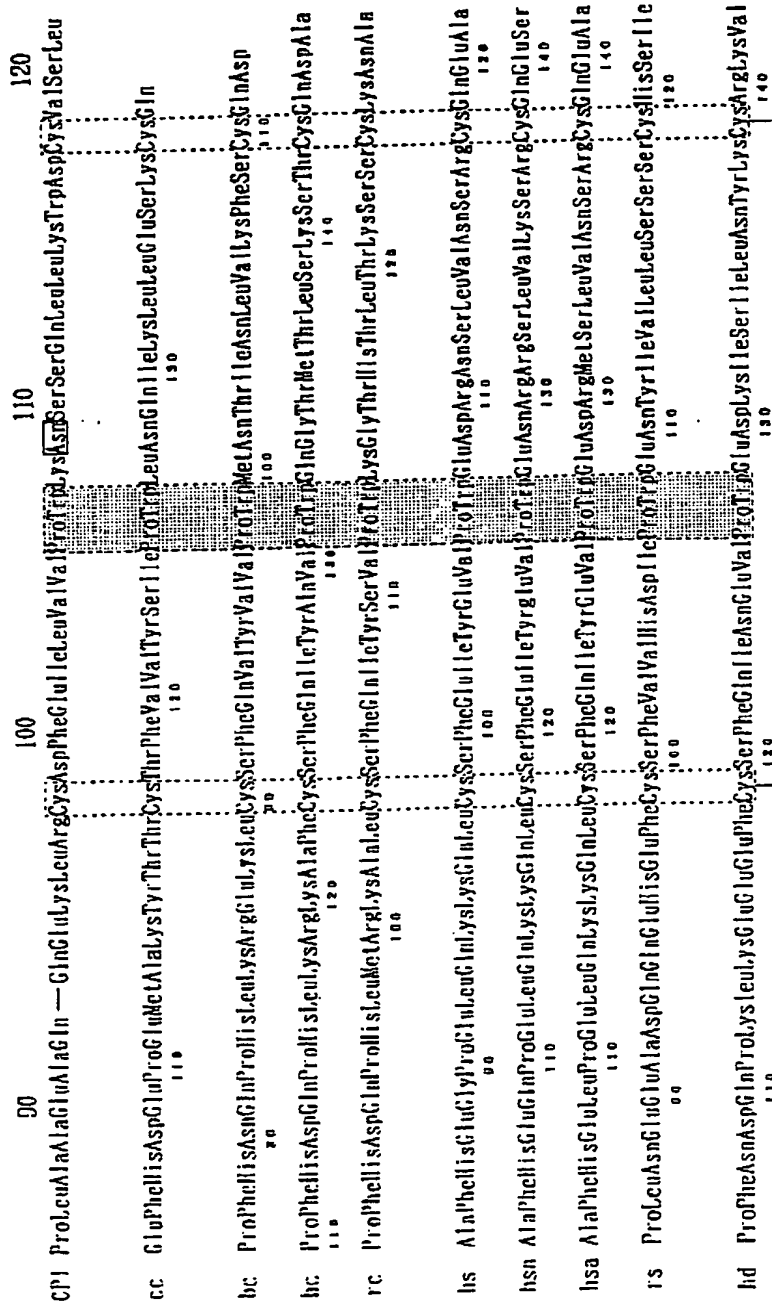
ファミリー2シスタチンのコンセンサス配列

グリコシル化部位

リン酸化部位

図. リン酸化部位  
CPL, 牛乳由来新規シグナル-ペプチド  
rc, トリシスタチンC hs, トリシスタチンS hsn, トリシスタチンSN hd, トリシスタチンD  
re, トリシスタチンC cc, 卵白シスタチン bc, 初乳シスタチン hc, トリシスタチンC

【図8】



ファミリー2システチンのコンセンサス配列

グリコシル化部位

リン酸化部位

CPI, 牛乳由来新規システチン7-ペプチド cc, 卵白システチン bc, 初乳システチン hc, トシステチンC  
 rc, トシステチンC hs, トシステチンS hsn, トシステチンSA hsn, トシステチンSN hd, トシステチンD